Journal of Iranian Plant Protection Research

https://jpp.um.ac.ir

Research Article
Vol. 37, No. 1, Spring 2023, p. 77-87

Application Effect of Ethalfluralin, Imazethapyr, and Metribuzin on Symbiosis of Soybean and Rhizobium

A. Aliverdi[1]*, Z. Mirjani[2]

Received: 22-02-2022
Revised: 08-01-2023
Accepted: 25-01-2023
Available Online: 25-01-2023

How to cite this article:
Aliverdi, A., & Mirjani, Z. (2023). Application effect of ethalfluralin, imazethapyr and metribuzin on symbiosis of soybean and rhizobium. *Journal of Iranian Plant Protection Research 37*(1): 77-87. (In Persian with English abstract). http://doi.org/10.22067/jpp.2023.75450.1080

Introduction

The world's population continues to grow, and agriculture must keep pace with increasing demand for food production. Many challenges threaten crop yields, such as herbivorous insects, plant pathogens and weeds, the occurrence or risk of each one often requires the use of pesticides. Despite the usefulness of pesticides in crop protection, their excessive and irrational use can endanger human health and the environment. On the other hand, the very costly application of chemical fertilizers, especially nitrogen, which is a key element in plant nutrition under insufficient soil fertility conditions, can cause groundwater pollution with nitrate and air pollution with nitrogen oxide (21). Although herbicides are intended to protect crops, they can potentially pose a threat to the activity of rhizobium that symbiosis with legumes, thereby reducing the nitrogen fixation of symbionts. If symbiotic nitrogen fixation is adversely affected, crop yield will subsequently be adversely affected (6). All previous studies on the effect of herbicides on crop-rhizobium symbiosis under a certain soil pH have been evaluated. Therefore, it is important to understand the interaction between soil pH and the toxicity severity of herbicides on crop-rhizobium symbiosis, because soil acidification or alkalization (4) can occur over several years in intensive agricultural ecosystems. Therefore, this study aimed to investigate whether the severity of herbicide toxicity on crop-rhizobium symbiosis in different soil pH conditions can be attributed to variations in the electrical charge properties of herbicides. Based on this hypothesis, three herbicides were selected: ethalfluralin, a non-ionic herbicide, imazethapyr, an acidic herbicide, and metribuzin, a basic herbicide (23). The objective was to examine their toxicity on soybean-rhizobium symbiosis under three soil pH levels.

Materials and Methods

The soil required for this experiment was prepared from the educational farm of Bu-Ali Sina University of Hamedan, which had a pH of 7.2. This soil is considered as natural soil. Based on a pre-test results on natural soil, adding and mixing 0.2 g sulfur and 5.5 g lime with each kg natural soil could create artificial soils with pH of 6.4 and 8, respectively. The pot experiment was performed in a completely randomized factorial design under open-air conditions. Herbicidal factor included control, pre-planting application of 990 g ethalfluralin ha^{-1}, post-planting application of 450 g metribuzin ha^{-1}and post-emergence application of 108 g imazethapyr ha^{-1}. Soil pH factor was 6.4, 7.2 and 8. Soybean seeds (cv. Hobbit) were disinfected with 1% sodium hypochlorite for five min and washed and dried with water. They were then immersed in commercial soybean inoculum (Biosoy^{TM}) for five min and dried again. Inside each pot, four seeds inoculated with bacteria were planted at two cm depth. Separately, an inoculated seed treatment under natural soil conditions without herbicide application was considered to investigate the effects of seed inoculation. Growth parameters including height, dry weight of stem and root, number and dry weight of nodes formed on root, the nitrogen content of stems and roots were measured and analyzed statistically using SAS software. The means were compared with the LSD test at the level of 5% probability.

---

1 and 2– Assistant Professor and Bachelor's Degree in Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, I.R. Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: a.aliverdi@basu.ac.ir)
DOI: 10.22067/jpp.2023.75450.1080

Results and Discussion

In comparing the two treatments of seed inoculation and non-inoculation with a commercial soybean inoculum and their cultivation in natural soil, it was found that seed inoculation had a significant positive impact on various growth parameters. Specifically, it led to increased plant height, dry weight of shoots and roots, as well as nitrogen content in both shoots and roots. Additionally, there was a notable decrease in the shoot-to-root dry weight ratio. Previous studies have also reported similar results, indicating changes in the photosynthetic response pattern due to bacterial seed inoculation in different soybean genotypes (16). In treatments where no herbicide was used (control), soybean nodulation and certain growth parameters were significantly influenced by soil pH. The highest level of nodulation was observed at soil pH values of 7.2 and 8.The lowest number of nodes (21.3 node plant^{-1}) and the lowest dry weight of nodes (491.8 mg plant^{-1}) were also observed in soil with a pH of 6.4. Poor nodulation observed at acidic soil pH may be associated with hydrogen ion toxicity, which may prevent the onset of nodulation, as reported in previous studies (3). The results showed that the toxicity severity of imazethapyr and metribuzin on nodulation (number and dry weight of nodules) depended on soil pH. As the pH of the soil increased, the toxicity of imazethapyr decreased, but the toxicity of metribuzin increased. While the toxicity severity of ethalfluralin on nodulation was not affected by soil pH.

Conclusion

Despite the advantages of herbicide application, it can have negative effects on soybean-rhizobium symbiosis, limiting the capacity of rhizobium for nitrogen fixation. Consequently, the reliance on chemical fertilizers increases to meet the nutritional needs of soybeans. Additionally, in acidic soils where herbicides are less absorbed by soil particles, further disruption of the soybean-rhizobium symbiosis can occur. Our experiment revealed that the use of metribuzin in alkaline pH soil or imazethapyr in acidic pH soil can cause severe damage to the soybean-rhizobium symbiosis. As soil acidity or alkalinity can change rapidly in agricultural ecosystems due to conventional farming practices such as lime or sulfur addition to adjust soil pH, it is crucial for farmers to consider the electrical charge of herbicides and the pH of their soil. This awareness can help minimize the herbicide toxicity on soybean-rhizobium symbiosis.

Keywords: Lime, Nitrogen, Nodulation, Sulfur

نشریه پژوهش‌های حفاظت گیاهان ایران
https://jpp.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۷، شماره ۱، بهار ۱۴۰۲، ص. ۸۷-۷۷

تأثیر کاربرد اتال‌فلورالین، ایمازتاپیر و متری‌بوزین بر همزیستی بین سویا و باکتری

اکبر علی وردی[۱*] - زینب میرجانی[۲]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۰۳
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۱۰/۱۸
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۰۵

چکیده

کاربرد علف‌کش‌ها ضمن کنترل علف‌های هرز می‌تواند بر همزیستی بین سویا و باکتری تأثیر منفی بگذارد. با کاهش ظرفیت باکتری برای تثبیت نیتروژن همزیست، نیاز به کاربرد کود شیمیایی نیتروژن افزایش می‌یابد که سبب آلودگی بیشتر خاک، آب و هوا می‌شود. برای درک اثر متقابل بین pH خاک و شدت سمیت علف‌کش‌ها بر همزیستی بین سویا با باکتری، آزمایش گلدانی در قالب طرح کاملاً تصادفی به صورت فاکتوریل تحت شرایط هوای آزاد انجام گرفت. فاکتور علف‌کش شامل شاهد، کاربرد پیش از کاشت ۹۹۰ گرم اتال‌فلورالین در هکتار، کاربرد پس از کاشت ۴۵۰ گرم متری‌بوزین در هکتار و کاربرد پس از رویشی ۱۰۸ گرم ایمازتاپیر در هکتار بود. فاکتور pH خاک شامل ۶/۴، ۷/۲ و ۸ بود. در تیمارهایی که علف‌کش استفاده نشده بود، گره‌زایی (تعداد و وزن خشک گره) و برخی پارامترهای رشد سویا تلقیح شده با باکتری به طور قابل توجهی تحت تأثیر pH خاک قرار گرفت. بیشترین گره‌زایی در pHهای ۷/۲ و ۸ خاک مشاهده شد. کمترین تعداد گره (۲۱/۳ گره در هر بوته) و کمترین وزن خشک گره (۴۹۱/۸ میلی‌گرم در هر بوته) نیز در خاک با pH برابر ۶/۴ مشاهده شد. شدت سمیت اتال‌فلورالین بر گره‌زایی تحت تأثیر pH خاک قرار نگرفت ولی شدت سمیت ایمازتاپیر و متری‌بوزین بر گره‌زایی به pH خاک بستگی داشت که متعاقباً سایر صفات سویا نیز بر همین اساس تحت تأثیر قرار گرفت. به طوری که شدت سمیت ایمازتاپیر بر گره‌زایی با افزایش pH خاک کاهش یافت. اما، شدت سمیت متری‌بوزین بر گره‌زایی با افزایش pH خاک افزایش یافت.

واژه‌های کلیدی: آهک، گره‌زایی، گوگرد، نیتروژن

مقدمه

جمعیت جهان همچنان در حال افزایش است و کشاورزی باید با افزایش تقاضا برای تولید غذا همگام شود. چالش‌های زیادی عملکرد گیاهان زراعی را تهدید می‌کند؛ مانند حشرات گیاهخوار، عوامل بیماریزای گیاهی و علف‌های هرز که وقوع یا خطر وقوع آنها اغلب مستلزم استفاده از آفت‌کش‌هاست. علی‌رغم مفید بودن آفت‌کش‌ها در حفاظت گیاهان، استفاده بیش از حد و غیر منطقی از آنها می‌توانند سلامت انسان و محیط زیست را به خطر بیاندازد. از طرفی دیگر، کاربرد بسیار پرهزینه کودهای شیمیایی به ویژه نیتروژن که عنصر کلیدی در تغذیه گیاه در شرایط حاصلخیزی ناکافی خاک است می‌تواند سبب آلودگی آب‌های زیرزمینی به نیترات و آلودگی هوا به اکسید نیتروژن شود (Ribeiro *et al*., 2021).

اکثر بقولات مانند سویا (*Glycine max*) قادر به همزیستی با باکتری اختصاصی خود (*Bradyrhizobium japonicum*) و تثبیت نیتروژن همزیست هستند. ماحصل همزیستی بین سویا و باکتری تقریباً ۴۵۰ کیلوگرم نیتروژن همزیست است که تقریباً معادل ۷۰ درصد نیاز سویا به نیتروژن را تامین می‌کند (Parsa *et al*., 2013). باکتری‌های همزیست با بقولات تنها موجوداتی حاوی آنزیم نیتروژناز هستند که می‌تواند نیتروژن اتمسفر (N_2) را به آمونیاک (NH_3) احیاء کنند تا قابل استفاده برای گیاهان شود. اگرچه گیاهان عملاً توسط N_2 احاطه شده‌اند، اما نمی‌توانند مستقیماً از آن بهره‌برداری نمایند. طبق گزارشهای قبلی، اسیدیته (pH) خاک کمتر از ۵/۶ و بیشتر از ۸ می‌تواند بر عملکرد باکتری همزیست اختلال ایجاد کند. از سوی

۱ و ۲- به‌ترتیب استادیار و دانشجوی سابق مقطع کارشناسی گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: a.aliverdi@basu.ac.ir)
DOI: 10.22067/jpp.2023.75450.1080

دیگر، عملکرد سویا در pH خاک کمتر از ۶ نیز می‌تواند دچار اختلال شود (Rao and Reddy, 2010).

اگرچه علف‌کش‌ها برای محافظت از گیاهان در نظر گرفته شده‌اند، اما می‌توانند به طور بالقوه تهدیدی علیه فعالیت باکتری‌های همزیست با بقولات باشند و در نتیجه میزان تثبیت نیتروژن همزیست را کاهش دهند. اگر تثبیت نیتروژن همزیست تحت تأثیر منفی قرار گیرد، عملکرد محصول نیز متعاقباً تحت تأثیر منفی قرار خواهد گرفت (Cycoń *et al*., 2009). بیشتر علف‌کش‌های مورد استفاده در لایه بالایی خاک، جایی که تعداد و فعالیت باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن بیشترین مقدار است، باقی می‌مانند (Ribeiro *et al*., 2021). پس از کاشت بذر تلقیح شده با باکتری، سلول‌های باکتریایی روی سطح بذر شروع به تکثیر جهت ایجاد عفونت اولیه و گره‌زایی می‌کنند (Singh, 2005). در همان دوره زمانی که بذر بیشترین احتیاج را به توانایی باکتری در تثبیت نیتروژن همزیست دارد، کاربرد علف‌کش‌های خاک مصرف رخ می‌دهد. مطمئناً، کاربرد علف‌کش خاک مصرف خطر بیشتری بر همزیستی بین گیاه میزبان و باکتری خواهد داشت، زیرا فرآیند عفونت اولیه و گره‌زایی ممکن است مختل شود. اما کاربرد علف‌کش‌های شاخ و برگ مصرف نیز می‌تواند بر همزیستی بین گیاه و باکتری خطرناک باشد (Cycoń *et al*., 2009). در تحقیقات متعدد قبلی، تأثیر منفی کاربرد علف‌کش‌های بنتازون و تریفلورالین (Gonzalez *et al*., 1999)، ایمازاکوئین، کلومازون، سولفن‌ترازون (Arruda *et al*., 2001)، متری‌بوزین (Zaidi *et al*., 2005)، فلوکلرالین، کلریمورون-متیل (Tortosa *et al*., 2021; Zawoznik and Tomaro, 2005)، لینورون (Sawicka and Selwet. 1998)، ایمازتاپیر (Bohm *et al*., 2009; Gonçalvesa *et al*., 2018; Jha *et al*., 2014;) (Parsa *et al*., 2013; Sawicka and Selwet. 1998; Zabalza *et al*., 2006)، گلایفوسیت (Fan *et al*., 2017; Bohm *et al*., 2009)، هالوکسی‌فوپ-پی-متیل (Parsa *et al*., 2013)، کلودینافوپ-پروپارژیل، آسی‌فلورفن (Jha *et al*., 2014)، پاراکوات (Tortosa *et al*., 2021)، کلرانسولام-متیل، فلومیوکسازین، سافلوفناسیل، استوکلر، متولاکلر، دی‌متینامید، پیروکساسولفون (Ribeiro *et al*., 2021) و لاکتوفون (Gonçalvesa *et al*., 2018) به اثبات رسیده است. در چنین شرایطی، می‌توان انتظار داشت که باکتری نتواند به ظرفیت کامل خود برای تثبیت نیتروژن همزیست برسد و در نتیجه وابستگی گیاه به کود شیمیایی نیتروژن افزایش یابد. البته، محققان محدودی نیز به تأثیر مثبت کاربرد علف‌کش‌ها بر همزیستی بین گیاه میزبان و باکتری اشاره کرده‌اند (Trimurtulu *et al*., 2015). آنها بیان می‌کنند که باکتری‌های همزیست با بقولات قادرند مقادیر پایین علف‌کش‌ها را در خاک تجزیه کنند. به عنوان مثال، سویه‌ای از باکتری همزیست (*Rhizobium* sp.) که از یک خاک کشاورزی جدا شده بود توانایی تجزیه بسیار فعال آترازین را دارد و از طریق فرآیند تجزیه علف‌کش می‌تواند منبعی دیگری برای تامین انرژی (علاوه بر کربوهیدرات‌ها از طریق فتوسنتز) برای رشد و نمو فراهم کند. از اینرو، نه تنها آنها اثرات سمی بر گیاه میزبان نمی‌گذارند، بلکه به واسطه تجزیه علف‌کش‌ها مقادیری هورمون گیاهی ایندول استیک اسید تولید می‌کنند که رشد گیاه میزبان را تحریک کرده و به گیاهان کمک می‌کند بر تنش ناشی از کاربرد علف‌کش غلبه کنند. در مطالعاتی که به تأثیر منفی کاربرد علف‌کش‌ها بر همزیستی بین گیاه میزبان و باکتری اشاره شده است، محققان چند مکانیسم را در این امر دخیل می‌دادند که عبارتند از: ۱) علف‌کش‌ها بطور مستقیم گیاه میزبان را تحت تأثیر قرار می‌دهند که منجر به کاهش انتقال منبع انرژی (کربوهیدرات‌ها) از گیاه میزبان به باکتری و در نتیجه کاهش تثبیت نیتروژن شد می‌شود (Anderson *et al*., 2004)، ۲) علف‌کش‌ها بطور مستقیم بقای باکتری در خاک را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Singh and Wright, 2002)، ۳)، علف‌کش‌ها شناسایی گیاه میزبان و تبادل سیگنال بین باکتری و گیاه میزبان را کاهش دهند (Daniel *et al*., 1999)، ۴) علف‌کش‌ها فعالیت نیتروژناز باکتری را تحت تاثیر قرار می‌دهند (Hernandez *et al*., 1999).

تمامی مطالعات قبلی در زمینه تأثیر علف‌کش بر همزیستی بین گیاه با باکتری تحت یک pH خاک مورد ارزیابی قرار گرفته است. از سوی دیگر، براساس خاصیت بار الکتریکی، علف‌کش‌ها به چهار گروه اسیدی، بازی، کاتیونی و غیر یونی دسته‌بندی می‌شوند (Monaco *et al*., 2002). خاصیت بار الکتریکی علف‌کش و pH خاک به عنوان عوامل موثر بر جذب و واجذب علف‌کش به ذرات خاکدانه مطرح هستند (Rigi *et al*., 2015). لذا، اینکه آیا در pHهای مختلف خاک، شدت سمیت علف‌کش‌ها بر همزیستی بین گیاه با باکتری تغییر خواهد کرد یا خیر اطلاعات کافی وجود ندارد. درک اثرمتقابل بین pH خاک و شدت سمیت علف‌کش‌ها بر همزیستی بین گیاه با باکتری مهم است؛ زیرا اسیدی شدن یا قلیایی شدن خاک (Bohm *et al*., 2009) می‌تواند در طی چند سال در اکوسیستم‌های کشاورزی فشرده رخ دهد. لذا، این امر می‌تواند بر شدت سمیت علف‌کش‌ها بر همزیستی بین گیاه با باکتری تأثیرگذار باشد. از اینرو، این پژوهش به دنبال پاسخ به این سوال انجام گرفت که آیا شدت سمیت علف‌کش‌ها بر همزیستی بین گیاه میزبان و باکتری در رژیم‌های مختلف pH خاک می‌تواند به تفاوت در خاصیت بار الکتریکی علف‌کش‌ها مرتبط باشد یا خیر. براساس این فرضیه، علف‌کش غیریونی اتال‌فلورالین، علف‌کش اسیدی ایمازتاپیر و علف‌کش بازی متری‌بوزین (Roberts, 1998) انتخاب شدند تا سمیت آنها بر همزیستی بین سویا و باکتری تحت سه pH خاک مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

خاک مورد نیاز برای این آزمایش از مزرعه آموزشی دانشگاه بوعلی سینا همدان که هیچ سابقه کشت سویایی در آن وجود نداشت تهیه شد. بافت این خاک لومی رسی (شن ۲۳/۶ درصد، ماسه ۴۷/۵ درصد و رس ۲۸/۹ درصد) با ۰/۷ درصد ماده آلی و pH برابر ۷/۲ بود. در این آزمایش، این خاک به عنوان خاک طبیعی در نظر گرفته شده است. براساس نتایج پیش آزمایشی بر روی خاک طبیعی، افزودن و مخلوط کردن ۰/۲ گرم گوگرد و ۵/۵ گرم آهک با هر کیلوگرم خاک طبیعی توانست به ترتیب خاک‌هایی مصنوعی با pH برابر ۶/۴ و ۸ را ایجاد کند. سپس، گلدان‌های پلاستیکی را جداگانه به مقدار ۱۵ کیلوگرم با هر کدام از خاک‌های تهیه شده پُر و هر پنج روز یکبار به مدت چهار هفته تا زمان کاشت آبیاری شدند.

آزمایش در محوطه بیرونی گلخانه تحقیقاتی دانشگاه بوعلی سینا همدان تحت شرایط هوای آزاد انجام گرفت که پارامترهای هواشناسی در طول مدت آزمایش شکل ۱ نمایش داده شده است. در اواخر بهار ۱۳۹۷، بذرهای سویا رقم هابیت با هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت پنج دقیقه ضدعفونی و با آب شستشو و خشک شدند. سپس، به مدت پنج دقیقه در مایع تلقیح تجاری سویا (بایوسوی، شرکت فن آوری زیستی طبیعت‌گرا) غوطه‌ور و مجدداً خشک شدند. درون هر گلدان، چهار بذر تلقیح شده با باکتری در عمق دو سانتی‌متری کاشته شدند. آبیاری اولیه از زیر گلدان انجام گرفت ولی پس از سبز شدن، گلدان‌ها هر سه روز یکبار آبیاری سطحی شدند. پس از سبز شدن، تعداد بوته‌ها به دو بوته در هر گلدان تنک شدند. طرح آزمایش در قالب کاملاً تصادفی به صورت فاکتوریل دو عاملی (علف‌کش و pH خاک) با چهار تکرار برای هر تیمار بود. فاکتور علف‌کش در چهار سطح شامل شاهد، کاربرد ۹۹۰ گرم اتال‌فلورالین در هکتار (سونالان، فرمولاسیون امولسیون شونده ۳۳ درصد) در قبل از کاشت به صورت مخلوط با لایه سطحی خاک، کاربرد ۱۰۸ گرم ایمازتاپیر در هکتار (پرسوئیت، فرمولاسیون مایع قابل حل در آب ۱۰ درصد) در مرحله دو برگی و کاربرد ۴۵۰ گرم متری‌بوزین در هکتار (سنکور، فرمولاسیون پودر خیس شونده ۷۵ درصد) در پس از کاشت بود. مقادیر علف‌کشی بکار رفته برابر مقادیر توصیه آنها بر روی برچسب هستند. فاکتور pH خاک نیز در سه سطح شامل ۶/۴، ۷/۲ (خاک طبیعی) و ۸ بود. علف‌کش‌ها با ۲۵۰ لیتر آب در هکتار در فشار ۳۰۰ کیلو پاسکال با استفاده از سمپاش پشتی فشاری مجهز به نازل بادبزنی القاء کننده هوا (AI11003VK) بکار برده شدند. به طور جداگانه، یک تیمار بذر تلقیح نشده تحت شرایط خاک طبیعی بدون کاربرد علف‌کش برای بررسی اثرات تلقیح بذر در نظر گرفته شد که با کمک آزمون *t* مورد مقایسه قرار گرفتند. در اواخر شهریور، بوته‌ها برای اندازه‌گیری پارامترهای رشد؛ از جمله ارتفاع، وزن خشک اندام‌های هوایی و ریشه، تعداد و وزن خشک گره‌های ایجاد شده روی ریشه، برداشت شدند. قبل از تجزیه و تحلیل آماری، این داده‌ها بر دو (تعداد بوته در هر گلدان) تقسیم شدند. برای اندازه‌گیری محتوی نیتروژن اندام‌های هوایی و ریشه، از ۵۰ میلی‌گرم مواد گیاهی خشک شده جهت هضم به روش میکروکجلدال استفاده شد (AOAC, 2016). برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SAS نسخه ۹،۴ استفاده شد. میانگین‌ها با آزمون حداقل اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد مقایسه شدند.

در تیمار بدون کاربرد علف‌کش، کارایی تثبیت نیتروژن (NFE) از حاصل تقسیم محتوی نیتروژن اندام‌های هوایی در هر یک از تیمارهای خاک مصنوعی بر محتوی نیتروژن اندام‌های هوایی در تیمار خاک طبیعی و سپس ضربدر ۱۰۰ محاسبه شد (Primieri *et al.*, 2016). در تیمار کاربرد علف‌کش‌ها، کارایی تثبیت نیتروژن در هر یک از pHهای خاک به طور جداگانه با استفاده از معادله زیر محاسبه شد که در آن H برابر محتوی نیتروژن اندام‌های هوایی در تیمار بدون کاربرد علف‌کش و C برابر محتوی نیتروژن اندام‌های هوایی در تیمار کاربرد علف‌کش است.

معادله ۱: $$NFE = (H/C) \times 100$$

نتایج و بحث

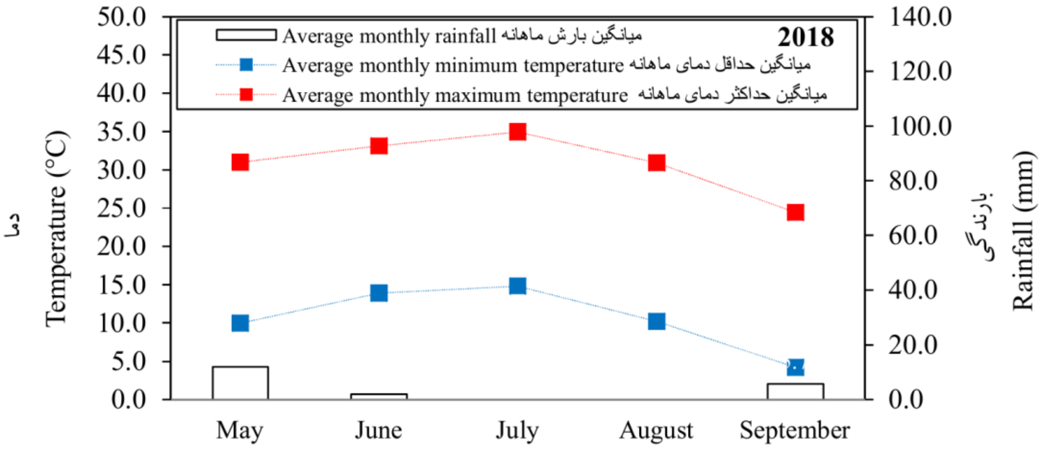
روی ریشه سویایی که بذر آن با باکتری تلقیح نشده و در خاک طبیعی (pH ۷/۲) پرورش یافته بود هیچ گره‌ی مشاهده نشد. در مقابل، روی ریشه سویایی که بذر آن با باکتری تلقیح شده و در خاک طبیعی پرورش یافته بود تعداد ۲۷/۱ گره در هر بوته (شکل ۲الف) با وزن خشک ۷۴۵/۲ میلی‌گرم در هر بوته (شکل ۲ب) تشکیل شد. گره‌ها عمدتاً روی ریشه اصلی مشاهده شدند. از آنجایی که گره‌زایی روی ریشه‌های جانبی نتیجه‌ای از حضور قبلی باکتری در خاک است (Rao and Reddy, 2010)، این مشاهده ما را به این نتیجه رساند که خاک طبیعی مورد استفاده در این آزمایش عاری از باکتری بوده است. با مقایسه دو تیمار تلقیح و عدم تلقیح بذر با باکتری و پرورش آن در خاک طبیعی با استفاده از آزمون *t* (p = ۰/۰۱)، نتیجه‌گیری شد که تلقیح بذر به طور معنی‌داری ارتفاع سویا را از ۲۴/۹ به ۳۹/۸ سانتی‌متر، وزن خشک اندام‌های هوایی را از ۶/۱ به ۱۳/۰ گرم در هر بوته، وزن خشک ریشه را از ۰/۸ به ۳/۱ گرم در هر بوته، محتوی نیتروژن اندام‌های هوایی را از ۲۴/۸ به ۳۶/۶ میلی‌گرم در هر گرم ماده خشک و محتوی نیتروژن ریشه را از ۱۲/۶ به ۲۳/۲ میلی‌گرم در هر گرم ماده خشک افزایش داد. همچنین، کاهش معنی‌داری در نسبت وزن خشک اندام‌های هوایی به ریشه از ۵/۸ در تیمار عدم تلقیح بذر با باکتری به ۴/۲ در تیمار تلقیح بذر با باکتری مشاهده شد.

قبلاً، نتایج مشابهی در رابطه با تغییر الگوی تخصیص مواد فتوسنتزی در پاسخ به تلقیح‌سازی بذر با باکتری در ژنوتیپ‌های

مختلف سویا گزارش شده است (Lestari *et al.*, 2006). کاهش در نسبت وزن خشک اندام‌های هوایی به ریشه در پی تلقیح بذر با باکتری می‌تواند بر توانایی سویا برای جذب منابع بیشتر تأثیر بگذارد و منجر به توانایی رقابتی بیشتر در مقابل علف‌های هرز شود که این موضوع می‌تواند در تحقیقات بعدی مورد توجه قرار گیرد.

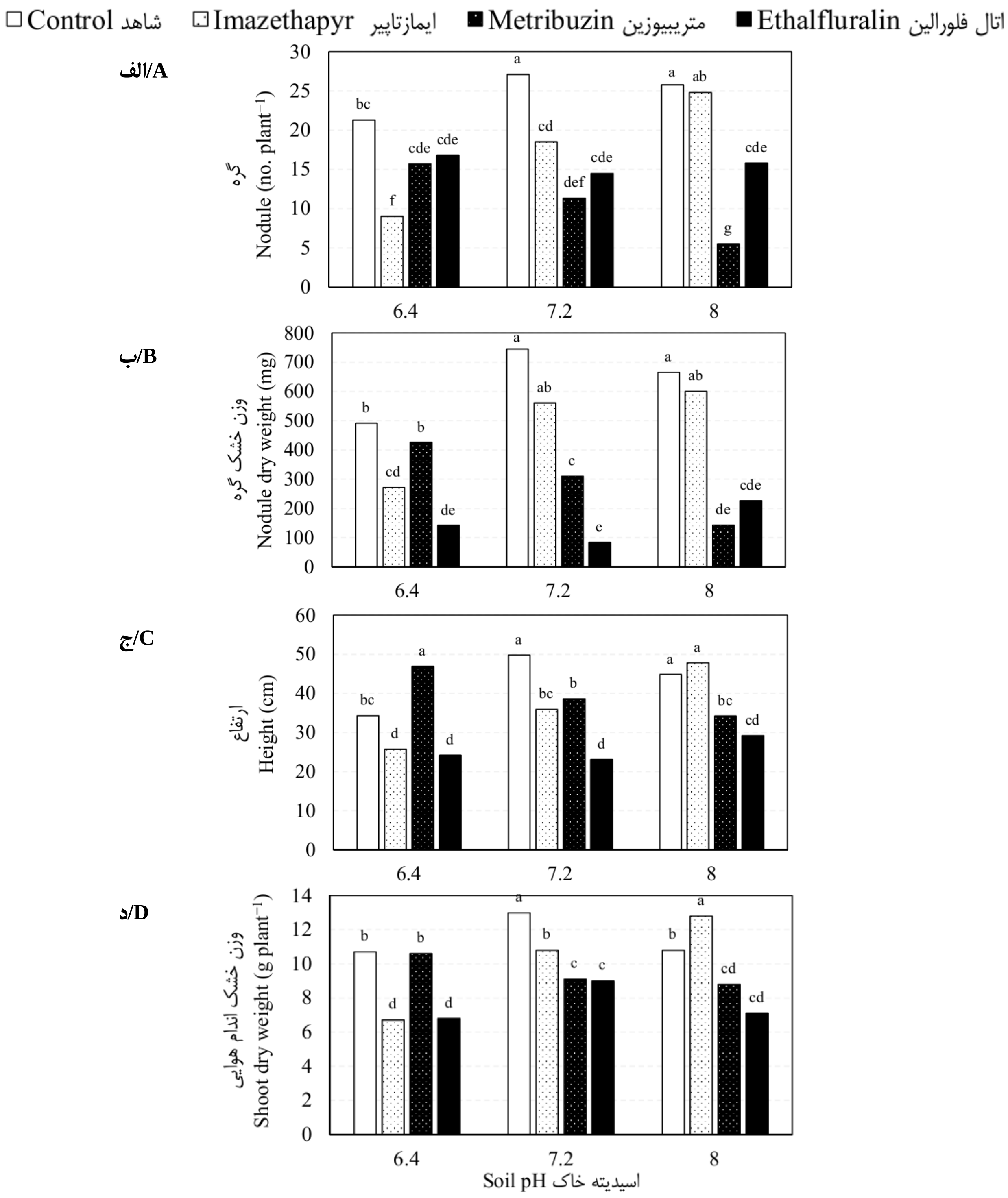
در تیمارهایی که هیچ علف‌کشی استفاده نشده بود (شاهد)، گره‌زایی و برخی پارامترهای رشد سویا تلقیح شده با باکتری به طور قابل توجهی تحت تأثیر pH خاک قرار گرفت (شکل‌های ۲ و ۳). بیشترین گره‌زایی در pHهای ۷/۲ و ۸ خاک مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند. کمترین تعداد گره (۲۱/۳ گره در هر بوته) و کمترین وزن خشک گره (۴۹۱/۸ میلی‌گرم در هر بوته) نیز در خاک با pH برابر ۶/۴ مشاهده شد (شکل‌های ۲الف و ب). گره‌زایی ضعیف مشاهده شده در pH خاک اسیدی می‌تواند با سمیت یون هیدروژن مرتبط باشد که می‌تواند از آغازش گره‌زایی جلوگیری کند که در مطالعات قبلی نیز گزارش شده است (Belda, 2014). در نتیجه ممانعت از آغازش گره‌زایی، سویای رشد یافته در خاک با pH برابر ۶/۴ کمترین ارتفاع (۳۴/۳ سانتی‌متر) را نیز داشت (شکل ۲ج). با این وجود، بیشترین وزن خشک اندام‌های هوایی سویا (۱۳/۰ گرم در هر بوته) در خاک با pH برابر ۷/۲ به دست آمد (شکل ۲د). وقتی هیچ علف‌کشی استفاده نشده بود، پارامترهای وزن خشک ریشه، نسبت وزن خشک اندام‌های هوایی به ریشه و محتوی نیتروژن ریشه تحت تأثیر تغییرات pH خاک قرار نگرفت (p = ۰/۰۵) (شکل‌های ۳الف، ب و د). در حالی که کاهش قابل توجهی در محتوی نیتروژن‌اند اندام‌های هوایی از ۳۶/۷ به ۳۲/۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک زیست توده با کاهش pH خاک از ۷/۲ به ۶/۴ مشاهده شد (شکل ۳ج). در حالت بدون کاربرد علف‌کش، کارایی تثبیت نیتروژن در خاک مصنوعی با pH برابر ۸ در مقایسه با خاک طبیعی دستخوش تغییر معنی‌داری نشد. این در حالی است که کارایی تثبیت نیتروژن در خاک مصنوعی با pH برابر ۶/۴ در مقایسه با خاک طبیعی حدوداً ۸۸/۷ درصد بود که نشان دهنده کاهش کارایی تثبیت نیتروژن با کاهش pH خاک است.

نتایج نشان داد که شدت سمیت علف‌کش‌های ایمازتاپیر و متری‌بوزین بر گره‌زایی (تعداد و وزن خشک گره) به pH خاک بستگی دارد. به طوری که با افزایش pH خاک، سمیت ایمازتاپیر کاهش یافت، ولی شدت متری‌بوزین بر گره‌زایی افزایش یافت. در حالی که شدت سمیت اتال‌فلورالین بر گره‌زایی تحت تأثیر pH خاک قرار نگرفت (شکل‌های ۲الف، ب). قبلاً، سمیت ایمازتاپیر (Bohm *et al.*, 2009; Gonçalvesa *et al.*, 2018; Jha *et al.*, 2014; Parsa *et al.*, 2013; Sawicka and Selwet. 1998; Zabalza *et al.*, 2006) و متری‌بوزین (Zaidi *et al.*, 2005) بر گره‌زایی در سویا گزارش شده بود، ولی تماماً در یک pH خاک معین. محققان قبلی بیان کرده‌اند که تعادل اسید ایندول استیک و یا فعالیت نیتروژناز در گیاه میزبان می‌تواند تحت تأثیر علف‌کش‌ها قرار گیرد (Jiang *et al.*, 2013). چنین تغییری می‌تواند ظرفیت تقسیم سلولی را کاهش دهد و یا سیگنال‌دهی بیوشیمیایی مورد نیاز برای آغازش گره‌زایی را غیرفعال کند و منجر به کاهش گره‌زایی شود (Kremer and Means, 2009).



شکل ۱- پارامترهای هواشناسی در دوره انجام آزمایش

Figure 1- Meteorological parameters during the period of the experiment

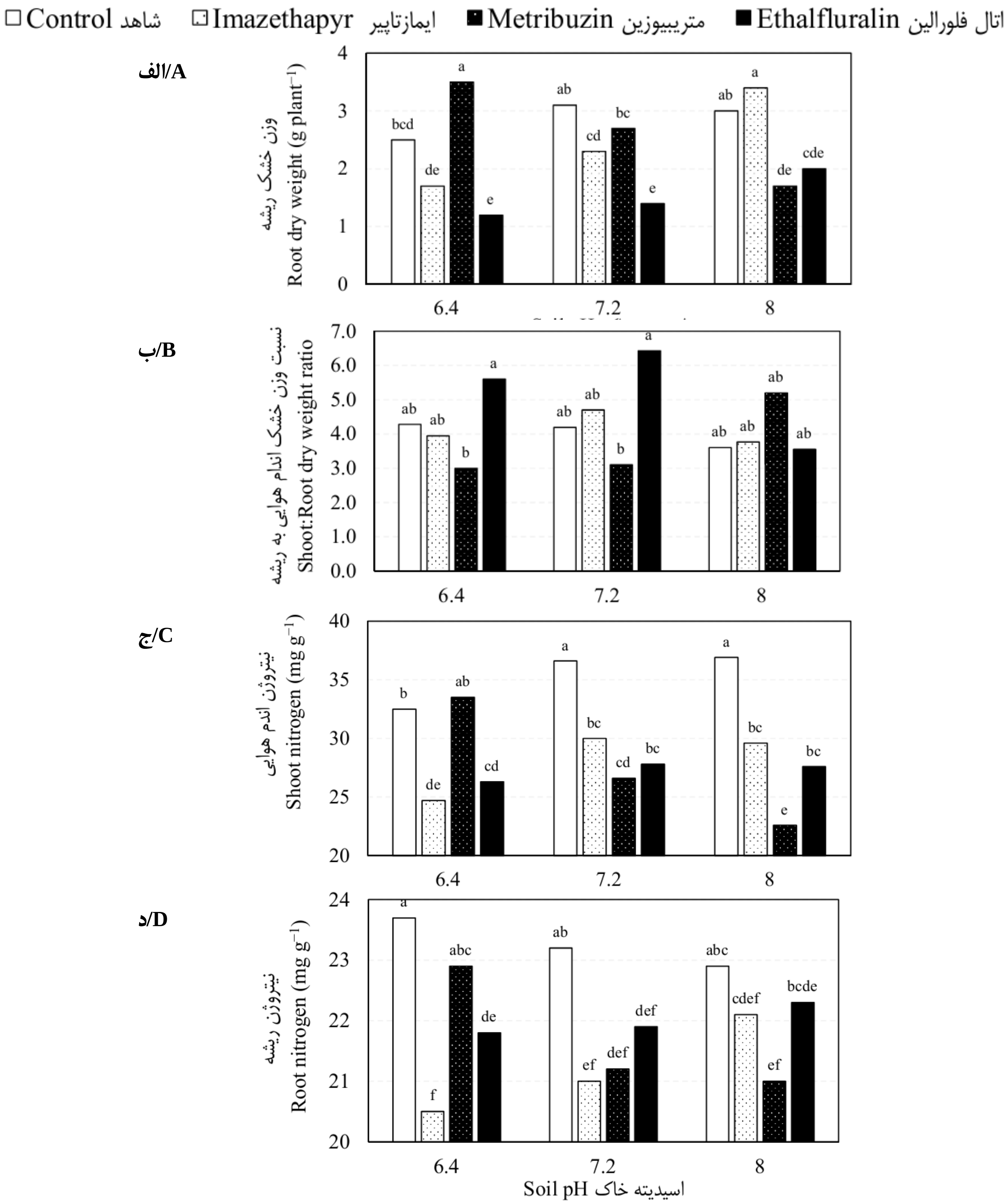


شکل ۲- تأثیر علف‌کش‌ها بر برخی صفات سویای رشد یافته در اسیدیته خاک مختلف

میانگین‌های دارای حرف مشترک اختلاف معنی‌دار ندارند (آزمون حداقل اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد).

Figure 2- Effect of herbicides on some soybean traits grown in different soil pH

Means with the same letter are not significantly different ($LSD_{0.05}$ test).



شکل ۳- تأثیر علف‌کش‌ها بر برخی صفات سویای رشد یافته در اسیدیته خاک مختلف

میانگین‌های دارای حرف مشترک اختلاف معنی‌دار ندارند (آزمون حداقل اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد).

Figure 3- Effect of herbicides on some soybean traits grown in different soil pH

Means with the same letter are not significantly different ($LSD_{0.05}$ test).

با این وجود، نتایج آزمایش حاضر نشان می‌دهد که سمیت ایمازتاپیر و متری‌بوزین، اما نه اتال‌فلورالین، بر گره‌زایی باکتریایی در ریشه سویا قویاً به pH خاک بستگی دارد. این یافته ممکن است به تفاوت در خاصیت بار الکتریکی و قطبیت علف‌کش‌ها در رژیم‌های مختلف pH خاک مربوط باشد. اتال‌فلورالین، علف‌کشی غیر یونی است؛ یعنی در تمام رژیم‌های pH خاک همیشه بدون بار الکتریکی است. ایمازتاپیر، علف‌کشی اسیدی ضعیف است؛ یعنی در pHهای قلیایی خاک مولکول‌های علف‌کش به شکل آنیون (دارایی بار الکتریکی منفی) هستند ولی در pHهای اسیدی خاک مولکول‌های علف‌کش به شکل غیر یونی (از نظر بار الکتریکی خنثی) هستند. متری‌بوزین، علف‌کشی بازی ضعیف است؛ یعنی در pHهای اسیدی خاک مولکول‌های علف‌کش به شکل کاتیون (دارایی بار الکتریکی مثبت) هستند ولی در pHهای قلیایی خاک مولکول‌های علف‌کش به صورت غیر یونی (از نظر بار الکتریکی خنثی) هستند (Monaco *et al.*, 2009). در pH اسیدی خاک، ایمازتاپیر، که به شکل غیر یونی است، کمتر می‌تواند به ذرات خاک جذب شود و لذا از نظر بیولوژیکی بیشتر در آب خاک در دسترس‌تر است؛ لذا، می‌تواند سمیت بیشتری علیه باکتری (همچنین برای سویا) ایجاد نماید که نمود آن در کاهش گره‌زایی نمایان شد (شکل ۲الف). در pH قلیایی خاک، وجود سطوح بالایی از کاتیون‌های دو و سه ظرفیتی آزاد در خاک ممکن است با آنیون ایمازتاپیر پیوند ایجاد کند؛ لذا، از نظر بیولوژیکی ایمازتاپیر کمتر در آب خاک آزاد و در دسترس‌تر باشد. به همین دلیل، سمیت ایمازتاپیر بر گره‌زایی در خاک با pH قلیایی کمتر بود (شکل ۲الف). در مقابل، در pH خاک اسیدی، از آنجایی که متری‌بوزین به شکل کاتیون است، به همین دلیل متری‌بوزین می‌تواند به ذرات خاک جذب شده بود و از نظر بیولوژیکی کمتر آزاد و در دسترس باشد؛ لذا سمیت کمتری علیه باکتری (همچنین علیه سویا) ایجاد نماید که نمود آن در افزایش گره‌زایی نمایان شد (شکل ۲الف). در منابع علمی قبلی که سمیت علف‌کش‌ها بر همزیستی بین سویا و باکتری را مطالعه کرده-اند، تناقض‌هایی را می‌توان روی شدت سمیت علف‌کش بر همزیستی بین سویا و باکتری مشاهده کرد. برای مثال، در یک تحقیق (Zaidi *et al.*, 2005)، همزیستی بین سویا و باکتری به طور نامطلوبی با کاربرد نصف دوز توصیه شده از علف‌کش فلوکلرالین تحت تأثیر قرار گرفته است. اما، در تحقیق دیگر (Khan *et al.*, 2004)، همزیستی بین سویا و باکتری با کاربرد مقدار دو برابری دوز توصیه شده از همین علف‌کش تحت تأثیر قرار نگرفته است. تفاوت pH خاک‌های مورد استفاده در این دو تحقیق می‌تواند دلیل احتمالی این تضاد باشد. متأسفانه pH خاک در متن هیچ یک از این منابع علمی گزارش نشده است. سمیت علف‌کش‌های اتال‌فلورالین، ایمازتاپیر و متری‌بوزین بر گره‌زایی باکتری متعاقباً بر سایر صفات سویا نیز تأثیرگذار بود. بدون وابستگی به pH خاک، کاربرد اتال‌فلورالین توانست ارتفاع (شکل ۲ج)، وزن خشک اندام‌های هوایی (شکل ۲د)، وزن خشک ریشه (شکل ۳الف)، محتوی نیتروژن اندام‌های هوایی (شکل ۳ج) و محتوی نیتروژن ریشه (شکل ۳د) سویا را به طور معنی‌داری در تمام رژیم‌های pH خاک کاهش داد. در مقابل، افزودن آهک و گوگرد به خاک طبیعی به ترتیب باعث کاهش و افزایش تأثیر منفی ایمازتاپیر بر ارتفاع سویا شد. تأثیر متری‌بوزین بر ارتفاع سویا به شدت به pH خاک وابسته بود. کاربرد متری‌بوزین منجر به یک اثر محرکی در خاک با pH برابر ۶/۴ ولی یک اثر کاهشی در خاک‌های با pH برابر ۷/۲ و ۸ بر ارتفاع سویا شد (شکل ۲ج).

با کاربرد ایمازتاپیر، وزن خشک اندام‌های هوایی سویا با کاهش pH خاک به طور معنی‌داری کاهش یافت. کاربرد ایمازتاپیر در خاک با pH برابر ۸ اثر محرکی بر وزن خشک اندام‌های هوایی سویا داشت. با کاربرد متری‌بوزین، وزن خشک اندام‌های هوایی سویا با افزایش pH خاک به طور معنی‌داری کاهش یافت. کاربرد متری‌بوزین در خاک با pH برابر ۶/۴ هیچ تأثیری بر وزن خشک اندام‌های هوایی سویا نداشت (شکل ۲د). ضمن اینکه کاربرد متری‌بوزین در خاک با pH برابر ۶/۴ دارای تأثیر محرکی بر وزن خشک ریشه سویا داشت، نتایج مربوط به صفات وزن خشک اندام هوایی و ریشه سویا دارای روند مشابهی بود (شکل ۳الف). کمترین محتوی نیتروژن اندام‌های هوایی (۲۲/۶ میلی‌گرم در هر گرم زیست توده خشک) در تیمار کاربرد متری‌بوزین در خاک با pH برابر ۸ مشاهده شد (شکل ۳ج). ولی کمترین محتوی نیتروژن ریشه (۲۰/۵ میلی‌گرم در هر گرم زیست توده خشک) در تیمار کاربرد ایمازتاپیر در خاک با pH برابر ۶/۴ مشاهده شد (شکل ۳د). به طور کلی، بجز در مورد تیمار کاربرد متری‌بوزین در خاک با pH برابر ۶/۴، کاربرد هر سه علف‌کش در تمام رژیم های pH خاک موجب کاهش محتوی نیتروژن اندام‌های هوایی سویا شد. همچنین، با افزایش pH خاک، محتوی نیتروژن اندام‌های هوایی سویا با ایمازتاپیر افزایش یافت، اما با متری‌بوزین کاهش یافت. به طور کلی، بجز در مورد تیمار کاربرد متری‌بوزین در خاک با pH برابر ۶/۴ و تیمار کاربرد اتال‌فلورالین در خاک با pH برابر ۸، کاربرد هر سه علف‌کش در تمام رژیم‌های pH خاک موجب کاهش محتوی نیتروژن ریشه سویا شد. همچنین، با افزایش pH خاک، محتوی نیتروژن ریشه سویا با کاربرد ایمازتاپیر افزایش یافت، اما با کاربرد متری‌بوزین کاهش یافت. دلیل اینکه در تیمارهای کاربرد علف‌کش صفات رشدی سویا با کاهش مواجه شدند را می‌توان به دو دلیل ارتباط داد: ۱) کاهش گره‌زایی که در این آزمایش به اثبات رسید و یا ۲) افزایش جذب ریشه‌ای علف‌کش در سویا که می‌توانند هزینه های فیزیولوژیکی جهت متابولیسم علف‌کش توسط سویا را افزایش دهد (Monaco *et al.*, 2002).

کمترین نسبت وزن خشک اندام‌های هوایی به ریشه سویا با کاربرد متری‌بوزین در خاک‌های با pH برابر ۶/۴ و ۷/۲ مشاهده شد

(شکل ۳ب). بجز در مورد تیمارهای مذکور، بین سایر تیمارها از نظر نسبت وزن خشک اندام‌های هوایی به ریشه سویا اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. از نتایج بدست آمده چنین می‌توان استنتاج کرد که توانایی سویا در جذب منابع (آب و عناصر غذایی از خاک) با کاربرد متری‌بوزین در pH خاک اسیدی افزایش می‌یابد. برای روشن شدن این موضوع به تحقیقات بیشتری نیاز است. بجز در مورد متری‌بوزین در خاک مصنوعی اسیدی (pH ۶/۴)، کاربرد تمامی علف‌کش‌ها سبب کاهش کارایی تثبیت نیتروژن در تمام رژیم‌های pH خاک شد. به طوری که در خاک مصنوعی اسیدی، کارایی تثبیت نیتروژن در تیمارهای کاربرد اتال‌فلورالین، ایمازتاپیر و متری‌بوزین در مقایسه با تیمار عدم کاربرد علف‌کش به ترتیب برابر ۸۰/۹، ۱۰۳/۱ و ۷۶/۰ درصد بود. در خاک مصنوعی، کارایی تثبیت نیتروژن در تیمارهای علفکشی مذکور در مقایسه با تیمار عدم کاربرد علف‌کش به ترتیب برابر ۷۸/۷، ۷۲/۷ و ۸۲/۰ درصد بود. نهایتاً، در خاک مصنوعی قلیایی، کارایی تثبیت نیتروژن در تیمارهای علفکشی مذکور در مقایسه با تیمار عدم کاربرد علف‌کش به ترتیب برابر ۷۴/۸، ۶۱/۲ و ۸۰/۲ درصد بود.

نتیجه‌گیری

علی‌رغم فواید بسیاری زیاد کاربرد علف‌کش‌ها، ولی آنها می‌توانند بر همزیستی بین سویا و باکتری تأثیر منفی بگذارند. بنابراین، باکتری نمی‌تواند به ظرفیت کامل خود برای تثبیت نیتروژن همزیست دست یابد؛ لذا، به منظور تغذیه کامل سویا نیاز به کاربرد کود شیمیایی افزایش می‌یابد. در اسیدیته خاکی که در آن علف‌کش کمتری به ذرات خاک جذب می‌شود، همزیستی بین سویا و باکتری نیز می‌تواند بیشتر مختل شود. بر اساس نتایج آزمایش حاضر، کاربرد متری‌بوزین در خاکی با pH قلیایی یا کاربرد ایمازتاپیر در خاکی با pH اسیدی می تواند به شدت بر همزیستی بین سویا و باکتری لطمه وارد کند. از آنجایی که اسیدی و قلیایی شدن خاک می‌تواند به سرعت در اکوسیستم‌های کشاورزی از طریق روش‌های کشاورزی مرسوم رخ دهد، مانند افزودن آهک یا گوگرد به خاک جهت اصلاح pH خاک، کشاورزان باید به ویژگی بار الکتریکی علف‌کش‌ها و pH خاک مزرعه خود توجه داشته باشند تا سمیت علف‌کش‌ها بر همزیستی بین سویا و باکتری را به حداقل برسانند.

سپاسگزاری

نویسندگان از مدیریت شرکت فن‌آوری زیستی طبیعت‌گرا که به صورت رایگان مایع تلقیح بذر سویا را تأمین کردند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌کنند.

منابع

1. Anderson, A., Baldock, J.A., Rogers, S.L., Bellotti, W., & Gill, G. (2004). Influence of chlorsulfuron on rhizobial growth, nodule formation, and nitrogen fixation with chickpea. *Australian Journal of Agricultural Research 55*(10): 1059-1070. https://doi.org/10.1071/AR03057.
2. AOAC. (2016). *Oicial methods of analysis of AOAC international, 20th edn. Latimer GW (ed)*. AOAC International, Washington, DC.
3. Arruda, J.S., Lopes, N.F., & Moura, A.B. (2001). Behavior of *Bradyrhizobium japonicum* strains under different herbicide concentrations. *Planta Daninha* 19: 111-117. https://doi.org/10.1590/S0100-83582001000100013.
4. Belda, K.D. (2014). *Effect of liming on root nodulation and grain yield of soybean at Bako agricultural research center, Western Ethiopia* (Doctoral dissertation, Haramaya University).
5. Bohm, G.M., Alves, B.J., Urquiaga, S., Boddey, R.M., Xavier, G.R., Hax, F., & Rombaldi, C.V. (2009). Glyphosate- and imazethapyr-induced effects on yield, nodule mass and biological nitrogen fixation in field-grown glyphosate-resistant soybean. *Soil Biology and Biochemistry 41*(2): 420-422. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.11.002.
6. Cycoń, M., Wójcik, M., & Piotrowska-Seget, Z. (2009). Biodegradation of the organophosphorus insecticide diazinon by *Serratia* sp. and *Pseudomonas* sp. and their use in bioremediation of contaminated soil. *Chemosphere 76*(4): 494-501. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.03.023.
7. Daniel, O., Meier, M.S., Schlatter, J., & Frischknecht, P. (1999). Selected phenolic compounds in cultivated plants: ecologic functions, health implications, and modulation by pesticides. *Environmental Health Perspectives* 107: 109-114. https://doi.org/10.1289/ehp.99107s1109.
8. Fan, L., Feng, Y., Weaver, D.B., Delaney, D.P., Wehtje, G.R., & Wang, G. (2017). Glyphosate effects on symbiotic nitrogen fixation in glyphosate-resistant soybean. *Applied Soil Ecology* 121: 11-19. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.09.015.
9. Gonçalvesa, C.G., Juniorm, A.C.S., Scarano, M., Pereirad, M.R.R., & Martins, D. (2018). Action of imazethapyr and lactofen on the nodulation of conventional and transgenic soybean under drought stress conditions. *Planta Daninha* 36: e018176280.
10. Gonzalez, N., Eyherabide, J.J., Barcelonna, M.I., Gaspari, A., & Sanmartino, S. (1999). Effect of soil interacting

herbicides on soybean nodulation in Balcarce, Argentina. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 34: 1167-1173. https://doi.org/10.1590/S0100-204X1999000700008.

11. Hernandez, A., Garcia-Plazaola, J.I., & Becerril, J.M. (1999). Glyphosate effects on phenolic metabolism of nodulated soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry 47*(7): 2920-2925. https://doi.org/10.1021/jf981052z.
12. Jha, B.K., Chandra, R., & Singh, R. (2014). Influence of post emergence herbicides on weeds, nodulation and yields of soybean and soil properties. *Legume Research 37*(1): 47-54. https://doi.org/10.5958/j.0976-0571.37.1.007
13. Jiang, L.X., Jin, L.G., Guo, Y., Tao, B., & Qiu, L.J. (2013). Glyphosate effects on the gene expression of the apical bud in soybean (*Glycine max*). *Biochemical and Biophysical Research Communications 437*(4): 544-549. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.06.112.
14. Khan, M.S., Zaidi, A., & Aamil, M. (2004). Influence of herbicides on chickpea-Mesorhizobium symbiosis. *Agronomie 24*(3): 123-127. https://doi.org/10.1051/agro:2004009.
15. Kremer, R.J., & Means, N.E. (2009). Glyphosate and glyphosate-resistant crop interactions with rhizosphere microorganisms. *European Journal of Agronomy 31*(3): 153-161. https://doi.org/10.1016/j.eja.2009.06.004.
16. Lestari, P., Van, K., Kim, M.Y., & Lee, S.H. (2006). Nodulation and growth of a super nodulating soybean mutant SS2-2 symbiotically associated with *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal AgroBiogen* 2: 8-15.
17. Monaco, T.J., Weller, S.C., & Ashton, F.M. (2002). *Weed science: principles and practices*. New York: Wiley.
18. Parsa, M., Aliverdi, A., & Hammami, H. (2013). Effect of the recommended and optimized doses of haloxyfop-P-methyl or imazethapyr on soybean-*Bradyrhizobium japonicum* symbiosis. *Industrial Crops and Products* 50: 197-202. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.019.
19. Primieri, S., Dalla Costa, M., Stroschein, M.R.D., Stocco, P., Santos, J.C.P., & Antunes, P.M. (2016). Variability in symbiotic effectiveness of N2 fixing bacteria in Mimosa scabrella. *Applied Soil Ecology* 102: 19-25. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.01.018.
20. Rao, A.S., & Reddy, K.S. (2010). Nutrient management in soybean. In: Singh G. (ed). *The soybean: botany, production and uses*. London: CABI.
21. Ribeiro, V.H.V., Maia, L.G.S., Arneson, N.J., Oliveira, M.C., Read, H.W., Ané, J.M., Santos, J.B., & Werle, R. (2021). Influence of PRE-emergence herbicides on soybean development, root nodulation and symbiotic nitrogen fixation. *Crop Protection* 144: 105576. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105576.
22. Rigi, M.R., Farahbakhsh, M., & Rezaei, K. (2015). Adsorption and desorption behavior of herbicide metribuzin in different soils of Iran. *Journal of Agricultural Science and Technology 17*(3): 777-787. http://jast.modares.ac.ir/article-23-8925-en.html.
23. Roberts, T.R. (1998). *Metabolic Pathways of Agrochemicals. Part 1: Herbicides and Plant Growth Regulators*. The Royal Society of Chemistry, UK: Cambridge.
24. Sawicka, A., & Selwet, M. (1998). Effect of active ingredients on *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* legume dinitrogen fixation. *Polish Journal of Environmental Studies* 7: 317-320.
25. Singh, G. (2005). Effects of herbicides on biological nitrogen fixation in grain and forage legumes–a review. *Agricultural Reviews 26*(2): 133-140.
26. Singh, G., & Wright, D. (2002). In vitro studies on the effects of herbicides on the growth of rhizobia. *Letters in Applied Microbiology 35*(1): 12-16. https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2002.01117.x.
27. Tortosa, G., Parejo, S., Cabrera, J.J., Bedmar, E.J., & Mesa, S. (2021). Oxidative stress produced by paraquat reduces nitrogen fixation in soybean-*Bradyrhizobium diazoefficiens* symbiosis by decreasing nodule functionality. *Nitrogen 2*(1): 30-40. https://doi.org/10.3390/nitrogen2010003.
28. Trimurtulu, N., Ashok, S., Latha, M., & Rao, A.S. (2015). Influence of pre-emergence herbicides on the soil microflora during the crop growth of Blackgram, *Vigna mungo* L. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 4*(6): 539-546.
29. Zabalza, A., Gaston, S., Ribas-Carbó, M., Orcaray, L., Igal, M., & Royuela, M. (2006). Nitrogen assimilation studies using 15N in soybean plants treated with imazethapyr, an inhibitor of branched-chain amino acid biosynthesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry 54*(23): 8818-8823.
30. Zaidi, A., Khan, M.S., & Rizvi, P.Q. (2005). Effect of herbicides on growth, nodulation and nitrogen content of greengram. *Agronomy for Sustainable Development 25*(4): 497-504. https://doi.org/10.1051/agro:2005050.
31. Zawoznik, M.S., & Tomaro, M.L. (2005). Effect of chlorimuron-ethyl on *Bradyrhizobium japonicum* and its symbiosis with soybean. *Pest Management Science 61*(10): 1003-1008. https://doi.org/10.1002/ps.1077.